

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-302219

(43) 公開日 平成11年(1999)11月2日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号

F I

C 0 7 C 57/26

C 0 7 C 57/26

A 6 1 K 7/00

A 6 1 K 7/00

X

C

K

U

審査請求 未請求 請求項の数 8 書面 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平10-144954

(22) 出願日

平成10年(1998)4月20日

(71) 出願人 000169466

高砂香料工業株式会社

東京都大田区蒲田五丁目37番1号

(72) 発明者 玉井 英子

神奈川県平塚市西八幡1丁目4番11号 高

砂香料工業株式会社総合研究所内

(72) 発明者 土屋 勝義

神奈川県平塚市西八幡1丁目4番11号 高

砂香料工業株式会社総合研究所内

(72) 発明者 西澤 陽一郎

神奈川県平塚市西八幡1丁目4番11号 高

砂香料工業株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 江幡 敏夫

最終頁に続く

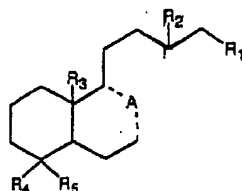
(54) 【発明の名称】 生理活性物質

(57) 【要約】

【課題】 とくに、メラニン産生抑制作用、細胞賦活作用、抗菌作用を有する化合物であって、しかも天然由来で安全且つ優しい化合物を提供する。

【解決手段】 下記一般式(1)で表される化合物の1種または2種以上を含有させる。一般式(1)

【化1】



式(1)

ただし、上記式(1)中、R¹は-CH₂OH、-COOR⁶または-COOXを示し、Xは塩を形成しうる基を示し、R⁶は水素あるいは炭素数が1ないし3の低級アルキル基を示し、R²からR⁵はそれぞれ水素またはメチル基を示し、…A…は=C(CH₃)-、-C(CH₃)=、-C(=CH₂)-、-CH(CH₃)-あるいは-C(OH)(CH₃)-を示す。

BEST AVAILABLE COPY

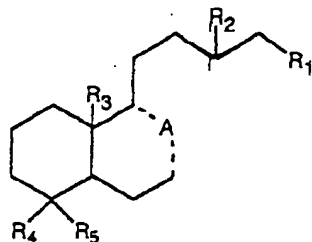
(2)

特開平11-302219

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記一般式(1)で表される化合物の1種または2種以上からなる生理活性物質。

【化1】



(1)ただし、上記式(1)中、R¹は-CH₂OH、-COOR⁶または-COOXを示し、Xは塩を形成しうる基を示し、R⁶は水素あるいは炭素数が1ないし3の低級アルキル基を示し、R²からR⁵はそれぞれ水素またはメチル基を示し、…A…は=C(CH₃)-、-C(CH₃)=、-C(=CH₂)-、-CH(CH₃)-あるいは-C(OH)(CH₃)-を示す。

【請求項2】一般式(1)に示す化合物が*Cistus ladaniferus* L.、*Cistus creticus* L.、*Cistus monoperiensis* L.、*Cistus salvifolius* (ハンニチバナ科)の植物体からの抽出物から調製された化合物である請求項1記載の生理活性物質。

【請求項3】請求項1記載の化合物の1種または2種以上を含有するメラニン産生抑制剤。

【請求項4】請求項1記載の化合物の1種または2種以上を含有する細胞賦活剤。

【請求項5】請求項1記載の化合物の1種または2種以上を含有する抗菌剤。

【請求項6】請求項1記載の化合物の1種または2種以上を含有する皮膚外用剤。

【請求項7】請求項1記載の化合物の1種または2種以上を含有する口腔用組成物。

【請求項8】請求項1記載の化合物の1種または2種以上を含有する浴用剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は特定の化合物からなる生理活性物質に関する。また、本発明はそれら化合物を含有するメラニン産生抑制剤、細胞賦活剤、抗菌剤などに関する。さらに、それら化合物を含有する皮膚外用剤、口腔用組成物、浴用剤などに関する。

【0002】

【従来の技術】従来から各種生理活性を有する化合物の開発が進められてきた。とくに天然物由来のものは安全であることなどから、数多くの報告がなされている。例えば、生理活性を有する化合物の代表的なものとしてメラニン産生抑制効果を有するものを例にして説明する。

シミ、ソバカスおよび日焼け後の肌への色素沈着は、加齢に伴い、発生、増加、あるいは消失しにくくなり、特に中高年齢層にとっては悩みとなっている。この様な後天的色素(メラニン)沈着の発生機序についてはまだ解明されていない点もあるが、ホルモンの異常、日光からの紫外線や酸素、化学物質などの外的刺激が原因となってメラニン色素が形成され、これが皮膚内に異常沈着するものと考えられている。このメラニンの形成と沈着を防ぐ薬剤の開発が強く望まれており、これまでに多くの薬剤が開発されてきている。これら薬剤の中にはアスコルビン酸およびその誘導体、プラセンタエキス、ハイドロキノン、コウジ酸、アルブチンおよびエラグ酸などがあり、さらに植物より抽出されるメラニン産生抑制成分としては多くの報告例があるがその中で、カミツレの抽出物(特開平8-92056号公報)、コガネバナ根エキス(特開平8-104616号公報)、クミンの種子(特開平8-119848号公報)、ウォロの抽出物(特開平10-29928号公報)などがある。また、本発明者らも各種植物の溶媒等による抽出物をシリカゲルクロマトグラフィーにて精製した画分がB16メラノーマ細胞のメラニン産生を強く抑制することを見だし特許を出願(特願平9-254025号、平成9年8月15日)している。またラブダン骨格を有する物質として*Dacrydium biforme*より抽出されるマヌール(特開平6-72855号公報)のメラニン産生抑制効果が報告されており、さらにその誘導体のメラニン産生抑制効果も報告されている(特開平7-25754号公報、特開平7-69858号公報、特開平7-206625号公報など)。しかしながらこれら従来のメラニン産生抑制剤は安定性、副作用、効果などの点で不十分なものが多く、新しいメラニン産生抑制剤が望まれていた。

【0003】また、細胞賦活物質について説明する。老化皮膚では皮膚細胞の働きが衰えることにより、シワ、タルミ等が生ずる。最近では皮膚細胞自体を賦活化し、皮膚の機能そのものを活性化して、皮膚症状を改善させる研究が多くなされており、衰えた細胞を活性化させるために細胞賦活物質の開発、およびそれら細胞賦活物質の皮膚外用剤への配合が注目されてきた。従来、細胞賦活作用を付与するものとしては、グリコール酸をはじめとする α -ヒドロキシ酸類、ホルモン類、ビタミン類、感光素、アラントインなど単一成分のものや、プラセンタエキス、乳酸菌エキス、またシコンエキス、アロエエキス、ニンジンエキス等の動植物エキスなどの抽出成分が利用されてきた。また、本発明者らも各種植物の溶媒等による抽出物の蒸留残渣に強い細胞賦活性があることを見だし特許を出願(特願平8-284572号、平成8年10月8日)している。またラブダン骨格を有する細胞分化誘導物質としてラブダナムフラノイドジテルペノイド(WO97/45099)が報告されてい

(3)

特開平11-302219

る。しかし、従来の細胞賦活作用を有する物質や抽出物は、その効果が満足でないものが多く、大量に配合しなければならなかったり、また保存安定性が十分でなかったり、刺激性があるなど安全性の面で問題点がみられるものも多かった。

【0004】さらに、抗菌物質について説明する。皮膚表面には数多くの菌が生息しており、その多くは健康な皮膚では問題を起こさないが、皮膚の状態の悪いときあるいは全身の状態の悪いときには毛包、汗口、損傷部位から侵入し感染症の原因菌となる。また、中にはワキガ臭やふけの原因となったり、分泌される脂肪を酸化してニキビの原因になるなどの悪影響を与える細菌も存在する。その様な菌を殺菌するために多くの薬剤が用いられてきているがそれらの多くは化学合成品であり、安全性の高い、天然物由来の抗菌物質が望まれてきた。Cistus ladaniferus L.、Cistus creticus L.、Cistus monoperiensis L.、Cistus salvifoliusなどの抽出物のひとつであるシスタスアブソリュートの抗菌活性については既に報告されている(日本化粧品技術者会誌 27巻、P227、1993)がその中の活性成分については触れられていない。

【0005】

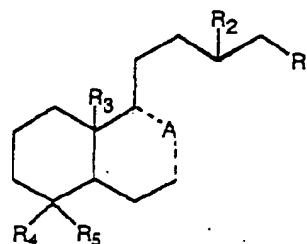
【発明が解決しようとする課題】本発明は、各種生理活性を有する化合物であって、しかも天然由来で安全且つ優しい化合物を提供することを目的とする。そのなかでも、とくに、メラニン産生抑制作用、細胞賦活作用、抗菌作用を有するものを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決すべく研究を重ねた結果、ハンニチバナ科に属するCistus ladaniferus L.、Cistus creticus L.、Cistus monoperiensis L.、Cistus salvifoliusなどの茎、枝、葉などの熱水抽出物あるいはエタノール、ヘキサンなどの抽出物に強いメラニン産生抑制作用、細胞賦活作用、抗菌作用を見だし、それがラブダノール酸に基づく活性である事を見だし、さらにその抽出物またはラブタソール酸を分子蒸留して得られるラブド-7-エン-15-オイックアシッド(labd-7-en-15-oic acid)、ラブド-8(17)-エン-15-オイックアシッド(labd-8(17)-en-15-oic acid)、ラブド-8-エン-15-オイックアシッド(labd-8-en-15-oic acid)に強いメラニン産生抑制作用、細胞賦活作用、抗菌作用を示すことを見出した。さらにそれらの塩あるいはメチルおよびエチルエステル体、さらにはそれらの還元体にも同様の活性のあることを見だし、検討を加え遂に本発明を完成させた。本発明の生理活性物質は下記一般式

(1)

【化2】



(1)

で表される化合物である。ただし、上記式中、 R^1 は $-CH_2OH$ 、 $-COOR^6$ または $-COOX$ を示し、 X は塩を形成しうる基を示し、 R^6 は水素あるいは炭素数が1ないし3の低級アルキル基を示し、 R^2 から R^5 はそれぞれ水素またはメチル基を示し、 $\cdots A \cdots$ は $=C(CH_3)-$ 、 $-C(CH_3)=$ 、 $-C(=CH_2)-$ 、 $-CH(CH_3)-$ あるいは $-C(OH)(CH_3)-$ を示す。ここで、 X としてはナトリウム、カリウム、アンモニウム等の塩を形成することができる基が、 R^6 としては水素、メチル基、エチル基、プロピル基などが挙げられる。なお、本発明においては、生理活性物質とはメラニン産生抑制作用、細胞賦活作用、抗菌作用の一つあるいは二つ以上の活性を有する物質をいう。

【0007】上記化合物は既に知られているものであり、その製法も知られている。例えばラブダノール酸はCistus ladaniferusより抽出されるラブダナムガムの成分(J. Chem. Soc., 1956, 4259-4262)であり、ラブド-8(17)-エン-15-オイックアシッド(エペルイン酸)とラブド-8-エン-15-オイックアシッドはラブダノール酸を化学的に処理をすることにより得られる(J. Chem. Soc., 1956, 4262-4271)。さらにエペルイン酸はマメ科のワラバツリー(Eperua falcata)の樹脂より(J. Chem. Soc., 1955, 658-662)、またラブド-7-エン-15-オイックアシッド(カチビン酸)は同じくマメ科のカチボツリー(Prioria copaifera G.)の樹脂中の成分である(J. Am. Chem. Soc., Vol. 79, 1201-1205, 1957)ことが報告されている。しかし、これらの物質がどのような生理活性を有するものであるか知られておらず、ましてやメラニン産生抑制作用、細胞賦活作用、抗菌作用を有することは全く知られていなかった。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明で規定する化合物を得るために用いられる植物は、該化合物を含む植物であるならば何ら限定されるものではないが、とくに Cistus ladaniferus L.、Cistus c

(4)

特開平11-302219

reticus L.、Cistus monoperi-
ensis L.、Cistus salvifoli-
us (ハンニチバナ科)の植物体を使用することが有利
である。これらを単独で、或いは2種以上を組み合わ
せて使用する。用いる植物体の部位は特に制限されるも
のではなく、葉、枝、幹、樹皮などを用いる。また、それ
らは採取直後でもよいし、乾燥させた後に用いてもよ
い。当該植物からの抽出法は、水、低級アルコールおよ
び石油エーテル並びに炭化水素の中から選ばれる1種若
しくは2種以上の溶媒を用いて行うことが望ましい。こ
こで低級アルコールとは、炭素数が1ないし4のアルコ
ールが用いられ、とくにメタノール、エタノール等が好
ましい。石油エーテルとしては、本出願前公知のもの
を用いることができるが、市販されたものを用いること
もできる。炭化水素溶媒としては、常温で液状の脂肪族炭
化水素、脂環式炭化水素、芳香族炭化水素が挙げられる
が、とくに常温で液状の脂肪族炭化水素、芳香族炭化水
素、その中でもとくにヘキサン、トルエンなどの炭化水
素が好ましい。

【0009】抽出操作は、上記植物や用いる溶媒により
異なるが、通常、上記溶媒に裁断した植物を室温乃至5
0℃の温度で浸漬または穏やかに攪拌して抽出する事
により行う。さらに本出願前周知のソックスレー抽出器な
どの装置を用いても良い。抽出に要する時間は、通常3
時間乃至48時間程度である。また本発明では、上記植
物の葉、枝或いは幹等を破碎した後、水蒸気蒸留または
熱水中で煮沸する方法を採用してもよい。この場合水蒸
気蒸留あるいは熱水抽出で水の上に浮いてくるガム分を
すくい取り、これを上記抽出に用いられる溶媒で不溶物
と分離することにより得られる。さらには、上記植物か
ら上記方法のどれかを用いて得られた市販品のものを利用
してもよい。この様にして得られた粗抽出物には25
～35%のラブダノール酸が含まれる。この粗抽出物を
そのままメラニン産生抑制剤、細胞賦活剤、抗菌剤とし
て用いても良い。

【0010】上記粗抽出物、あるいは市販の抽出物から
含有される酸あるいは酸混合物を得る代表的な方法につ
いて説明するが、本発明はこの例に何ら限定されるもの
ではない。上記粗抽出物、あるいは市販の抽出物を、
0.1～0.5mmHgの減圧下で分子蒸留を行い16
0℃から230℃までの、より望ましくは18℃から
220℃までの留分を集めると、この留分にはラブド
ー7-エン-15-オイックアシッド、ラブド-8(1
7)-エン-15-オイックアシッド、ラブド-8-エ
ン-15-オイックアシッドの混合物が含まれる。メラ
ニン産生抑制剤、細胞賦活剤、抗菌剤としてはこの酸の
混合物のまま用いても良いし、また必要に応じて塩とし
て、あるいはメチルまたはエチルのエステル体として用
いることもできる。

【0011】次にこの酸の混合物から3種の酸を分離す

る。具体的には、この酸の混合物をエタノールに溶解
し、触媒量の硫酸の共存下反応させてエチルエステル体
とし、硝酸銀処理したシリカゲルで作成したシリカゲル
クロマトグラフィー処理する。カラムをヘキサンで洗
い、次いで1%酢酸エチル-ヘキサンで溶出する。はじ
めにラブド-8-エン-15-オイックアシッドエチル
エステルが溶出し、次いでラブド-7-エン-15-オ
イックアシッドエチルエステル、ラブド-8(17)-
エン-15-オイックアシッドエチルエステルの順で溶
出される。溶媒を留去し、それぞれのエチルエステル体
の純品を得た。得られたエチルエステル体を加水分解し
て遊離の酸を、さらに遊離の酸をジアゾメタンと反応さ
せてメチルエステル体とした。

【0012】かくして得られた酸、メチルエステル、エ
チルエステル、あるいはそれらの二種以上の混合物はメラ
ニン産生抑制剤、細胞賦活剤、抗菌剤として有用であ
る。さらに、これらを、例えば皮膚外用剤、浴用剤、口
腔用組成物などに配合することにより、メラニン産生抑
制能、細胞賦活能、抗菌能などを有する皮膚外用剤、浴
用剤、口腔用組成物などを得ることができる。また、本
発明の化合物(1)を含有させて抗老化剤、抗しわ剤な
どを得ることもできる。上記メラニン産生抑制剤、細胞
賦活剤、抗菌剤の配合量は、皮膚外用剤では0.01～
10重量%、好ましくは0.05～5重量%、浴用剤
では0.1～10重量%、好ましくは0.2～5重量%、
口腔用組成物では0.1～10重量%、好ましくは0.
2～5重量%、抗菌剤では0.01～5重量%、好まし
くは0.05～2重量%である。また、化粧水、乳液、
クリーム等に配合する場合は、通常0.05～10重量
%、好ましくは0.05～2重量%である。メラニン産
生抑制剤、細胞賦活剤、抗菌剤などの配合の仕方は、と
くに限定されない。例えば、香料に用いられる通常の有
機溶媒であるエチレングリコール、プロピレングリコー
ルや低級アルコールの単独または混合液、その他の界面
活性剤との混合液で希釈した後に配合するか、常用の香
料素材と混合した後に配合してもよい。あるいは、他の
物質を共存させることなく、そのまま配合してもよい。

【0013】また、本発明のメラニン産生抑制剤、細胞
賦活剤、抗菌剤などには、上記必須成分以外に、通常の
化粧品、医薬部外品、医薬品等の皮膚外用剤に用いられ
る成分、例えば、美白剤、細胞賦活剤、保湿剤、酸化防
止剤、油性成分、界面活性剤、増粘剤、無機充填剤、着
色剤、pH調整剤、防腐剤、香料、紫外線吸収剤、各種
皮膚栄養剤等を目的または必要に応じて適宜配合するこ
とができる

【0014】これらの配合成分について、それらの一部
を以下に例示する。美白剤としてはアルブチン、コウジ
酸、エラグ酸、アスコルビン酸等とそれらの各種誘導
体、プラセンタエキス等、各種植物や動物由来の抽出物
などが例示できる。細胞賦活剤としてはグリコール酸な

(5)

特開平11-302219

どの α -ヒドロキシ酸、ホルモン類、ビタミン類、各種動物、植物の抽出物などがあげられる。保湿剤としてはソルビトール、キシリトール、グリセリン、プロピレングリコール、ピロリドンカルボン酸ナトリウム、乳酸、ヒアルロン酸、コラーゲンなど、酸化防止剤としてはビタミンE、ブチルオキシトルエン、ブチルオキシアニソールなど、油性成分としては流動パラフィン、パラフィン、オリーブ油、やし油などの植物性油脂、牛脂、豚脂、ミンク油、スクワランなどの動物性油脂、メチルポリシロキサン、シリコンオイル、トリイソパルミチン酸グリセリンなどの合成油脂などが例示できる。

【0015】界面活性剤としてはラウリル硫酸ナトリウム、ラウリン酸トリエタノールアミンなどの陰イオン性の界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウムクロライド、塩化ベンザルコニウムなどの陽イオン性界面活性剤、グリセリルモノステアレート、ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ショ糖エステルなどの非イオン性界面活性剤が例示され、増粘剤としてはカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、カラギーナンなどが、無機充填剤としてはタルク、セリサイト、マイカ、カオリン、亜鉛華、雲母、酸化チタン、酸化マグネシウムなど、pH調整剤としてはクエン酸、クエン酸ナトリウムなどの有機酸およびその塩類、防腐剤としては尿素、メチルパラベン、エチルパラベンなどのパラベン類、安息香酸ナトリウム、エチルアルコールなどが例示できる。また種々の紫外線吸収物質を添加することにより、日焼け防止効果を向上させることもできる。

【0016】

【実施例】以下に実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによってなんら限定されるものではない。

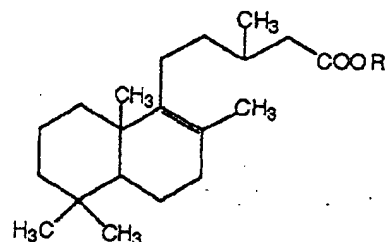
【0017】

【実施例】市販のラブダナムアブソリュート（ジボーダン社製）を分子蒸留に掛ける。ラブダナムアブソリュート（10g）を減圧下（0.1mmHg）で分子蒸留を行い180℃から220℃までの留分（4.3g）を集める。この留分にはラブド-8-エン-15-オイックアシッド（化合物1）、ラブド-7-エン-15-オイックアシッド（化合物4）、ラブド-8（17）-エン-15-オイックアシッド（化合物7）の混合物が含まれる（この混合物を以下酸混合物という）。酸混合物（1g）をエーテル（2ml）に溶解し、ジアゾメタンを滴下しメチルエステル体（0.96g）を得た（このメチルエステル体を以下メチルエステル混合物という）。同様にこの酸混合物（10g）をエタノール（100ml）に溶解し、硫酸触媒存在下にてエステル化を行いエチルエステル体（9.5g）を得た（このエチルエステル体を以下エチルエステル混合物という）。

【0018】

【実施例】次にこれら3種の酸を分離するために上記エチルエステル混合物をシリカゲルクロマトグラフィーにかける。エチルエステル混合物（10g）をヘキサン（100ml）に溶解し、硝酸銀処理したシリカゲルで作成したカラムに注ぎ込み、ついで溶媒を注ぎ込み、溶出する。注ぎ込む溶媒は、最初はヘキサンとし、ついでヘキサンに酢酸エチルを1容量%加えた混合溶媒とする。はじめにラブド-8-エン-15-オイックアシッドエチルエステルが溶出し、次いでカチビン酸エチルエステル、エベルイン酸エチルエステルの順で溶出される。それぞれの成分のみを含む溶出液を集めて溶媒を留去し、それぞれのエチルエステル体の純品（溶出順に0.83g、0.16gおよび0.63g）を得た。得られたエチルエステル体を常法により加水分解して遊離の酸を得た。さらに遊離の酸にジアゾメタンを滴下し、溶媒を留去してメチルエステル体とした。

【化3】

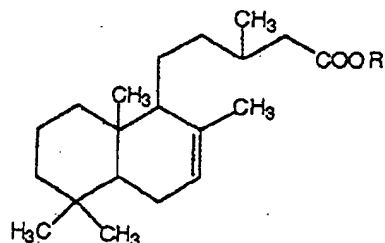


化合物（1）：R=H（ラブド-8-エン-15-オイックアシッド）

化合物（2）：R=CH₃

化合物（3）：R=C₂H₅

【化4】



化合物（4）：R=H（ラブド-7-エン-15-オイックアシッド）

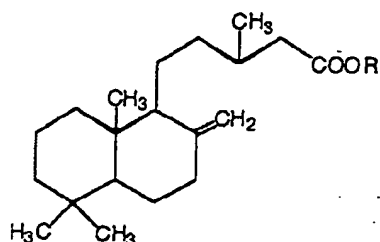
化合物（5）：R=CH₃

化合物（6）：R=C₂H₅

【化5】

(6)

特開平11-302219



化合物(7): R=H (ラブド-8(17)-エン-15-オイックアシッド)

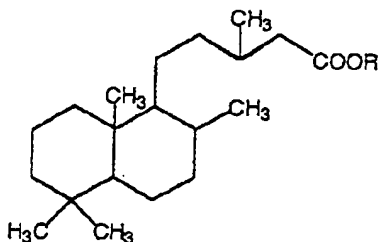
化合物(8): R=CH₃

化合物(9): R=C₂H₅

【0019】

【実施例3】実施例1で得られたエチルエステル混合物(4.3g)をエタノール(10ml)に溶解し、5%パラジウムカーボン触媒(0.2g)を加えて水素添加反応を行い、化合物11(4.1g)を得た。さらに加水分解して化合物10が得られる。

【化6】



化合物(10): R=H (ラブダン-15-オイックアシッド)

化合物(11): R=C₂H₅

【0020】

【実施例4】実施例1で得られたエチルエステル混合物(3.2g)をテトラヒドロフラン(10ml)に溶解し、リチウムアルミニウムハイドライド(0.21g)をテトラヒドロフラン(10ml)に加えた溶液中に常温で滴下してラブド-8-エン-15-オイックアシッド(化合物1)、ラブド-7-エン-15-オイックアシッド(化合物4)、ラブド-8(17)-エン-15-オイックアシッド(化合物7)混合物の末端がCH₂OHのアルコール体混合物(2.32g)が得られた。このアルコール体混合物をそのままメラニン産生抑制剤、細胞賦活剤、抗菌剤として用いても良い。

【0021】

【試験例1】メラニン産生抑制試験

B16メラノーマ細胞を底面積25平方cmの細胞培養ボトルに1ボトル当たり8万個となるように8mlの10%FBS(牛胎児血清)を含むDMEM(ダルベッコ変法イーグル培地)で調製して加え、37℃で5%二酸化炭素存在下にて3日間培養する。培養3日目に古い培地を捨て、新しい培地8mlと交換する。更にそこに表に示す最終濃度になるようにエタノールに溶解したサンプル40μlを添加した。コントロールとしてはエタノールのみを加えたものを用いた。培地交換後さらに3日間同条件で培養する。培養終了後、培地を除去、トリプシン処理で細胞を回収し、リン酸緩衝食塩水(PBS)で懸濁液とし、その一定量を用いコールターカウンターで細胞数の計測を行い、細胞増殖率を求める。細胞増殖率は下記の式により求める。

$$\text{細胞増殖率 (\%)} = \frac{\text{試料細胞数}}{\text{コントロール細胞数}} \times 100$$

残りの細胞懸濁液は、遠沈後5%トリクロロ酢酸、エタノール/エチルエーテル(3:1容量比)、エチルエーテルを用いて細胞を洗い、さらに細胞を乾燥後2N-NaOHを加え70℃に加温しながら細胞(中のメラニ

ン)を溶解し、420nmの吸光度を測定する。測定値は合成メラニンの検量線より換算して、細胞百万個あたりのメラニン量を算出しメラニン産生抑制率を下記の式により求めた。

$$\text{メラニン抑制率 (\%)} = \frac{\text{コントロールメラニン量} - \text{試料メラニン量}}{\text{コントロールメラニン量}} \times 100$$

メラニン抑制率60%以上で細胞増殖率70%以上のときは、安全性に優れ、しかもメラニン産生抑制作用も優れていることを意味するものであり、実用的なものであ

る。

【0022】

【表1】メラニン産生抑制率

$$\text{細胞増殖率 (\%)} = \frac{\text{試料細胞数}}{\text{コントロール細胞数}} \times 100$$

(7)

特開平11-302219

| サンプル | 濃度(ppm) | メラニン抑制率 | 細胞増殖率 |
|------------|---------|---------|-------|
| 粗抽出物 | 6.3 | 7.5% | 110% |
| 酸混合物 | 6.3 | 77% | 143% |
| メチルエステル混合物 | 6.3 | 80% | 122% |
| エチルエステル混合物 | 6.3 | 75% | 122% |
| 化合物1 | 3.1 | 80% | 109% |
| 化合物3 | 6.3 | 74% | 115% |
| 化合物4 | 6.3 | 87% | 109% |
| 化合物6 | 6.3 | 74% | 109% |
| 化合物7 | 6.3 | 79% | 111% |
| 化合物9 | 6.3 | 61% | 103% |
| 化合物10 | 6.3 | 83% | 97% |
| 化合物11 | 6.3 | 75% | 107% |
| コウジ酸 | 200.0 | 34% | 94% |
| アルブチン | 6.3 | 74% | 100% |
| エラグ酸 | 3.1 | 68% | 98% |

【0023】

16メラノーマ細胞のメラニン産生抑制率と増殖率を調べその併用効果を見た。

【試験例2】既存チロシナーゼ阻害剤との併用試験

試験例1の方法でチロシナーゼ阻害活性を示すアルブチン、コウジ酸、エラグ酸と本発明化合物とを混合してB

【0024】

【表2】アルブチンとの併用効果

コントロールメラニン量-試料メラニン量

$$\text{メラニン抑制率 (\%)} = \frac{\text{コントロールメラニン量} - \text{試料メラニン量}}{\text{コントロールメラニン量}} \times 100$$

| サンプル | 濃度(ppm) | メラニン抑制率 | 細胞増殖率 |
|----------|---------|---------|-------|
| 酸混合物(A) | 0.4 | 9% | 103% |
| 化合物1(B) | 0.4 | 22% | 115% |
| 化合物4(C) | 0.4 | 28% | 115% |
| アルブチン(E) | 0.8 | 22% | 89% |
| (A)+(E) | 0.4+0.8 | 52% | 128% |
| (B)+(E) | 0.4+0.8 | 54% | 132% |
| (C)+(E) | 0.4+0.8 | 56% | 127% |

【0025】

【表3】コウジ酸との併用効果

サンプルのOD - ブランクのOD

$$\text{阻害率} = (1 - \frac{\text{サンプル無添加のOD} - \text{ブランクのOD}}{\text{サンプルのOD} - \text{ブランクのOD}}) \times 100$$

サンプル無添加のOD - ブランクのOD

(8)

特開平11-302219

| サンプル | 濃度(ppm) | メラニン抑制率 | 細胞増殖率 |
|---------|---------|---------|-------|
| 酸混合物(A) | 0.4 | 37% | 114% |
| 化合物1(B) | 0.4 | 46% | 122% |
| 化合物4(C) | 0.4 | 51% | 119% |
| 化合物7(D) | 0.4 | 34% | 130% |
| コウジ酸(E) | 200 | 34% | 94% |
| (A)+(E) | 0.4+200 | 55% | 96% |
| (B)+(E) | 0.4+200 | 43% | 96% |
| (C)+(E) | 0.4+200 | 71% | 96% |
| (D)+(E) | 0.4+200 | 54% | 113% |

【0026】

【表4】エラグ酸との併用効果

| サンプル | 濃度(ppm) | メラニン抑制率 | 細胞増殖率 |
|---------|---------|---------|-------|
| 酸混合物(A) | 0.4 | 17% | 106% |
| 化合物7(B) | 0.4 | 30% | 111% |
| エラグ酸(C) | 1.6 | 17% | 98% |
| (A)+(C) | 0.4+1.6 | 31% | 111% |
| (B)+(C) | 0.4+1.6 | 31% | 100% |

表2、3、4に見られる通り本発明物質とこれらのチロシナーゼ阻害物質とを併用して用いると、それぞれを単独で用いたときより高いメラニン産生抑制効果を示し、細胞増殖率もこれらチロシナーゼ阻害物質単独で用いたよりも高くなっていることが判る。このことよりこれらの物質と本発明化合物とを混合して用いることにより、より強い併用美白効果を示すことが示される。

【0027】

【試験例3】モルモット紫外線誘導色素斑に対する消退効果

5匹の褐色モルモットの背部毛を丁寧に剃毛した後、剃毛部に2.5cm平方の開口部4個を設けた遮光板を当て、そこにUVB領域の紫外線を450mj/cm²の強度で隔日に3回照射した。紫外線の照射終了直後より、照射部位に1日1回、35日間サンプル70μlずつを連続塗布することによる色素斑消退量を表5記載の日にちに調べた。試料としては本発明化合物の内、実施例4で得られた酸混合物を1%含むエタノール溶液を用い、コントロールとしてはエタノールのみを塗布した。

活性の評価はそれぞれの塗布部位を色差計（ミノルタカメラ株式会社、CR200b）で測定を行い、得られた試料塗布部のL値（経時変化値）から試料塗布開始直前の試料塗布部のL値を差し引いたΔL値を求め、同様にして得られたエタノール塗布部のΔL値を差し引いたΔΔL値により行った。なお、ΔΔL値は以下の式により求められる。

$$\Delta\Delta L = (L_x - L_0) - (L'_x - L'_0)$$

L₀：試料塗布前の被験部位（試料塗布部位）のL値

L_x：試料塗布x日後の被験部位（試料塗布部位）のL値

L'₀：エタノール塗布前の被験部位（エタノール塗布部位）のL値

L'_x：エタノール塗布x日後の被験部位（エタノール塗布部位）のL値

同じ実験をコウジ酸7%を含むエタノール溶液についても行った。結果を表5に示す。

【0028】

【表5】ΔΔL値の変化

| サンプル | 濃度 | ΔΔL値 | | |
|------|----|------|------|------|
| | | 14日 | 28日 | 35日 |
| 酸混合物 | 1% | 0.30 | 2.25 | 2.15 |
| コウジ酸 | 7% | 1.32 | 1.52 | 1.40 |

表5に見られる通り、本発明化合物の一つである酸混合物にはコントロールに比して明らかな色素斑の消退作用が認められた。その作用は28日目以降ではコウジ酸よ

りも強く、また経時変化で見るとコウジ酸の方が14日目までの早い時期に活性を示すことが認められた。

【0029】

(9)

特開平11-302219

【試験例4】マッシュルームチロシナーゼ阻害試験

市販のマッシュルーム由来チロシナーゼ (Sigma社製) を用いてチロシナーゼ阻害活性を調べた。リン酸塩緩衝液 2.3 ml に表 6 に示す最終濃度になるようにサンプル溶液 0.2 ml を加え、これに市販チロシナーゼ溶液 (1000 単位/ml) 0.1 ml を加え、さらに

基質として L-チロシン溶液 (0.3 mg/ml) 0.4 ml を加え、37℃ で 30 分反応させた。反応終了後、波長 490 nm の吸光度 (OD) を測定し次式によりチロシナーゼ反応の阻害率を求めた。比較としてチロシナーゼ阻害剤として知られているアルブチン、コウジ酸についてもテストした。

$$\text{サンプルのOD} - \text{ブランクのOD}$$

$$\text{阻害率} = \left(1 - \frac{\text{サンプルのOD} - \text{ブランクのOD}}{\text{サンプル無添加のOD} - \text{ブランクのOD}}\right) \times 100$$

$$\text{サンプル無添加のOD} - \text{ブランクのOD}$$

サンプル：緩衝液と酵素溶液と基質溶液とサンプル溶液

サンプル無添加：緩衝液と酵素溶液と基質溶液

ブランク：緩衝液と酵素溶液

【0030】

【表6】マッシュルームチロシナーゼ阻害率

| サンプル | 濃度(ppm) | 阻害率 |
|-------|---------|-----|
| 酸混合物 | 2.5 | 0% |
| 化合物1 | 2.5 | 0% |
| 化合物4 | 2.5 | 0% |
| 化合物7 | 2.5 | 0% |
| アルブチン | 100 | 29% |
| コウジ酸 | 2.5 | 67% |

表 6 に見られる通り、チロシナーゼ阻害剤として知られているアルブチンおよびコウジ酸はマッシュルームチロシナーゼを阻害するが本発明のメラニン産生抑制剤である化合物は阻害活性を示さず、従ってその作用はチロシナーゼの阻害でない可能性が示された。

【0031】

【試験例5】B16メラノーマ細胞のチロシナーゼ阻害試験

B16メラノーマ細胞を 10% FBS を含む DMEM で 37℃、5% 2 酸化炭素存在下に 3 日間培養した。培養後増殖した細胞をトリプシン処理して回収し、トリトン X100 を 0.1% 含む PBS に 100 細胞/ml の割合で懸濁して超音波処理を行って細胞を破碎した。これを 11000 G で 20 分間遠心し、得られた上清を粗酵素液として使用した。リン酸塩緩衝液で表 7 に示す最終濃度になるように調製したサンプル溶液 0.2 ml を加え、これに粗酵素液 0.2 ml を加えて、5 分間 37℃ で予熱した後、基質として L-DOPA 溶液 (0.5 mg/ml) 0.2 ml を加え、37℃ で 3 時間反応させた。反応終了後、波長 490 nm の吸光度 (OD) を測定し、試験例 4 に示す式によりチロシナーゼ反応の阻害率を求めた。比較としてチロシナーゼ阻害剤として知られているアルブチンおよびコウジ酸についてもテストした。

【0032】

【表7】B16メラノーマ細胞のチロシナーゼ阻害率

| サンプル | 濃度(ppm) | 阻害率 |
|-------|---------|-----|
| 酸混合物 | 2.5 | 0% |
| 化合物1 | 2.5 | 0% |
| 化合物4 | 2.5 | 0% |
| 化合物7 | 2.5 | 0% |
| アルブチン | 100 | 35% |
| コウジ酸 | 2.5 | 62% |

表 7 に見られる通りチロシナーゼ阻害剤として知られているアルブチンおよびコウジ酸は B16メラノーマ細胞のチロシナーゼを阻害したが本発明のメラニン産生抑制剤である化合物は阻害活性を示さなかった。

【0033】

【試験例6】細胞賦活性試験

10% FBS を含む DMEM にヒト由来正常皮膚線維芽細胞 (NB1RGB: 理化学研究所製) を、2 万細胞/ml となるように接種した後、この細胞接種液を 25 平方 cm ボトルに各 5 ml 入れ、37℃、5% 2 酸化炭素存在下に 24 時間培養後、各ボトルに本発明化合物の添加濃度が最終的にそれぞれ表 8 のようになるようにエタノールに溶解して、そのエタノール溶液を 0.2% の濃度で添加しさらに 3 日間培養した。ここで古い培地を捨て新しい培地 5 ml を加え、またサンプルを添加した。培地交換後さらに 3 日間培養し、トリプシン (DIFCO 製) により、細胞を剥離し、コールターカウンター (Sysmex 製) で各ボトルの細胞数を計測した。同時に、エタノールのみを添加して培養したものを対照区として、同様の操作で培養、細胞計測を行った。試料液を添加したボトルの培養後の細胞数を、培養後の対照区の細胞数を 100 とした時の相対値で求め、その結果を表 8 に示した。なお、比較例として細胞賦活性が知られているグリコール酸についても併せて示した。

【0034】

【表8】線維芽細胞の細胞増殖率

(10)

特開平11-302219

| サンプル | 濃度(ppm) | 細胞増殖率 |
|------------|---------|-------|
| 粗抽出物 | 8.0 | 130% |
| 酸混合物 | 8.0 | 130% |
| メチルエステル混合物 | 4.0 | 126% |
| エチルエステル混合物 | 4.0 | 110% |
| 化合物3 | 8.0 | 134% |
| 化合物6 | 8.0 | 134% |
| 化合物7 | 8.0 | 128% |
| 化合物9 | 8.0 | 127% |
| 化合物10 | 8.0 | 126% |
| 化合物11 | 8.0 | 104% |
| アルコール体混合物 | 4.0 | 138% |
| グリコール酸 | 4.0 | 120% |

表8に示すとおり本発明化合物は線維芽細胞にたいして強い細胞増殖賦活性1示した。

【0035】

【試験例7】抗菌活性試験

下の表9に示す好気性菌12菌種と嫌気性菌2菌種を用いてテストを行った。好気性菌は寒天培地希釈法で、嫌気性菌については液体培地希釈法で、また培養も嫌気条件でおこなった。

寒天培地希釈法

培地はミューラーヒントン寒天培地(DIFCO)を加熱溶解後10mlずつ試験管に分注、滅菌して使用した。サンプルは全て表に示す初濃度の100倍濃度のエタノール溶液を作り、エタノールで順次2倍希釈を行い、溶解した寒天培地10ml中に100μlの割合でサンプル溶液を加え、攪拌したのちに径9cmのシャーレに流して、室温で固化させた。試験菌はよく生育したスラントより1白金耳を10mlのミューラーヒントンブロス(DIFCO)に移植、27℃24時間振盪培養したものを菌液として使用した。菌数が10の8乗CFU(Colony Forming Unit)/mlになるように希釈しその5μlを寒天の上に接種して、37℃で一晩培養した。菌の接種は佐久間製作所のミク

ロプランターMIT-Pの27本用を用いて行った。MICの判定はエタノール100μlを加えたミューラーヒントン寒天平板に試験菌を接種、生育させたコントロールと比較する事により行い、菌の生育の見られない濃度をMIC(Minimum Inhibitory Concentration: 最小阻止濃度)とした。

液体培地希釈法

GAMブロス(日水)をネジ蓋つき試験管にそれぞれ10mlを分注、滅菌したものを用いた。サンプルは順次2倍希釈を行いサンプル原液とした。サンプル溶液の各100μlをネジ蓋つき試験管に加え軽く攪拌したのち試験菌液(10の7乗CFU/ml)を100μl加えネジ蓋を締めて37℃で培養した。なお、試験菌液はネジ蓋つき試験管にGAMブロス10mlを分注したものに種菌液100μlを加えネジ蓋をして37℃で一晩培養して調製した。MICの判定はエタノール100μlを加えたコントロールと比較する事により行い、菌の生育の見られない濃度を最小阻止濃度とした。

【0036】

【表9】試験菌

(11)

特開平11-302219

| 菌株名 | 試験菌コード |
|---|--------|
| 好気性菌 | |
| Staphylococcus epidermidis JCM 2414 | Se-1 |
| Staphylococcus epimermidis var. H-6 | Se-2 |
| Corynebacterium minutissimum ATCC 23348 | Cm-1 |
| Corynebacterium xerosis JCM 1324 | Cx-2 |
| Malassezia furfur IFO 0656 | Mf-1 |
| Staphylococcus aureus IFO 12732 | Sa-3 |
| Bacillus subtilis PCI 219 IFO 3134 | Bs-1 |
| 嫌気性菌 | |
| Propionibacterium acnes ATCC 12818 | Pa-1 |
| Streptococcus mutans JCM 5175 | Su-1 |

【0037】

【表10】抗菌試験結果 (MIC: 単位ppm)

(MIC: 単位ppm)

| 試験菌 | サンプル名 | | | | |
|------|-------|------|------|------|-------|
| コード | 酸混合物 | 化合物1 | 化合物4 | 化合物7 | 化合物10 |
| Se-1 | 12.5 | 6.3 | 12.5 | 6.3 | 6.3 |
| Se-2 | 12.5 | 6.3 | 12.5 | 6.3 | 6.3 |
| Cm-1 | 12.5 | 6.3 | 6.3 | 12.5 | 6.3 |
| Cx-2 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 6.3 |
| Mf-1 | 6.3 | 6.3 | 6.3 | 6.3 | 6.3 |
| Sa-3 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 6.3 |
| Bs-1 | 12.5 | 6.3 | 12.5 | 12.5 | 6.3 |
| Pa-1 | NT | 12.5 | NT | NT | 12.5 |
| Su-1 | NT | 6.3 | NT | NT | 6.3 |

この表においてNTはテストしていないことを示す

【0038】表10に示すごとく本発明化合物の内、それぞれの遊離酸は腋臭の原因菌 (Se-1, Se-2)、フケの原因菌 (Mf-1)、ニキビの原因菌 (Pa-1)、虫歯の原因菌 (Su-1) などに強い活性を示した。

【0039】

【実施例5】本発明のメラニン産生抑制剤を用いて、以下の処方により化粧水、乳液、クリーム、パック、バスソルト、クリームファンデーションを調製した。(1)

化粧水

【表11】

| 成分 | 配合量 (重量%) |
|-----------------------|-----------|
| 濃グリセリン | 3.0 |
| 1,3-ブチレングリコール | 2.0 |
| モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン | 1.0 |
| エタノール | 5.0 |
| 香料 | 適量 |
| 酸混合物 (実施例1) | 1.0 |
| 防腐剤 | 適量 |
| 精製水 | 100%とする |

【0040】(2) 乳液

【表12】

(12)

特開平11-302219

| 成分 | 配合量 (重量%) |
|-----------------------------|-----------|
| スクワラン | 5.0 |
| ワセリン | 2.0 |
| ミツロウ | 0.5 |
| ソルビタンセスキオレイン酸エステル | 0.8 |
| ポリオキシエチレンオレイルエーテル (20 E.O.) | 1.2 |
| 化合物1 (実施例2) | 0.5 |
| 香料 | 適量 |
| 防腐剤 | 適量 |
| 保湿剤 (プロピレングリコール) | 5.0 |
| エタノール | 5.0 |
| 粘液質 (カルボキシビニルポリマー1.0%水溶液) | 20.0 |
| アルカリ (水酸化カリウム) | 0.1 |
| 精製水 | 100%とする。 |

【0041】(3) クリーム

【表13】

| 成分 | 配合量 (重量%) |
|-----------------------------|-----------|
| スクワラン | 5.0 |
| ワセリン | 2.0 |
| ミツロウ | 0.5 |
| ソルビタンセスキオレイン酸エステル | 0.8 |
| ポリオキシエチレンオレイルエーテル (20 E.O.) | 1.2 |
| 香料 | 適量 |
| エチルエステル混合物 (実施例1) | 1.0 |
| 防腐剤 | 適量 |
| 保湿剤 (プロピレングリコール) | 5.0 |
| エタノール | 5.0 |
| 粘液質 (カルボキシビニルポリマー1.0%水溶液) | 20.0 |
| アルカリ (水酸化カリウム) | 0.1 |
| 精製水 | 100%とする。 |

【0042】(4) パック

【表14】

| 成分 | 配合量 (重量%) |
|--------------------|-----------|
| ポリビニルアルコール | 15.0 |
| カルボキシメチルセルローズナトリウム | 5.0 |
| プロピレングリコール | 3.0 |
| エタノール | 10.0 |
| 香料組成物 | 適量 |
| 化合物10 (実施例3) | 1.0 |
| 防腐剤と酸化防止剤 | 適量 |
| 精製水 | 100%とする。 |

【0043】(5) 浴用剤 (顆粒タイプ)

【表15】

(13)

特開平11-302219

| 成分 | 配合量 (重量%) |
|--------------------|-----------|
| ポリビニルアルコール | 15.0 |
| カルボキシメチルセルローズナトリウム | 5.0 |
| プロピレングリコール | 3.0 |
| エタノール | 10.0 |
| 香料 | 適量 |
| 化合物4 (実施例2) | 0.5 |
| 防腐剤と酸化防止剤 | 適量 |
| 精製水 | 100%とする。 |

【0044】(6) クリームファンデーション

【表16】

| 成分 | 配合量 (重量%) |
|-------------------|-----------|
| ステアリン酸 | 5.0 |
| 親油性モノステアリン酸グリセリン | 2.5 |
| セトステアリアルアルコール | 1.0 |
| モノラウリン酸プロピレングリコール | 3.0 |
| 流動パラフィン | 7.0 |
| ミリスチン酸イソプロピル | 8.0 |
| パラオキシ安息香酸ブチル | 適量 |
| トリエタノールアミン | 1.2 |
| ソルビット | 3.0 |
| パラオキシ安息香酸メチル | 適量 |
| 酸化チタン | 8.0 |
| カオリン | 5.0 |
| タルク | 2.0 |
| ベンナイト | 1.0 |
| 着色顔料 | 適量 |
| 酸混合物 (実施例1) | 1.0 |
| 精製水 | 100%とする。 |

【発明の効果】本発明により、特定植物の抽出物の精製物が優れたメラニン産生抑制活性、細胞賦活性、抗菌活性を有していることが明らかとなった。この精製物からなるメラニン抑制剤は、シミ、ソバカスおよび日焼け後の肌への色素沈着を改善または防止する効果、所謂美白作用が優れているだけでなく安全性、安定性に優れるものである。さらにこの精製物は皮膚細胞自体を賦活化

し、皮膚の機能そのものを活性化して、皮膚症状を改善させ、さらには抗菌活性を示し腋臭、ふけ、ざ創などの予防、治療に有効な皮膚外用剤として利用できる。これらの生理活性物質はクリーム、ローション、乳液、パック等の基礎化粧品、ファンデーション等のメイクアップ化粧品、浴用剤、皮膚外用剤、口腔用組成物などへ配合する事ができる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

FI

A61K 7/16

A61K 7/16

7/26

7/26

7/48

7/48

7/50

7/50

31/19

AED

31/19

AED

31/215

ADT

31/215

ADT

35/78

ADZ

35/78

ADZC

(14)

特開平11-302219

C07C 69/608

C07C 69/608

(72)発明者 花田 實
神奈川県平塚市西八幡1丁目4番11号 高
砂香料工業株式会社総合研究所内

(72)発明者 所 一彦
神奈川県平塚市西八幡1丁目4番11号 高
砂香料工業株式会社総合研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.